

Docket No. 0010-1070-0

IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

IN RE APPLICATION OF: Vitaliy A. LIVSHITS, et al.

GAU:

SERIAL NO: New Application

EXAMINER:

FILED: Herewith

FOR: NOVEL GENE AND METHOD FOR PRODUCING L-AMINO ACIDS

REQUEST FOR PRIORITY

ASSISTANT COMMISSIONER FOR PATENTS
WASHINGTON, D.C. 20231

SIR:

- Full benefit of the filing date of U.S. Application Serial Number, filed, is claimed pursuant to the provisions of 35 U.S.C. §120.
- Full benefit of the filing date of U.S. Provisional Application Serial Number , filed , is claimed pursuant to the provisions of 35 U.S.C. §119(e).
- Applicants claim any right to priority from any earlier filed applications to which they may be entitled pursuant to the provisions of 35 U.S.C. §119, as noted below.

In the matter of the above-identified application for patent, notice is hereby given that the applicants claim as priority:

<u>COUNTRY</u>	<u>APPLICATION NUMBER</u>	<u>MONTH/DAY/YEAR</u>
RUSSIA	98123511	December 23, 1998

Certified copies of the corresponding Convention Application(s)

- are submitted herewith
- will be submitted prior to payment of the Final Fee
- were filed in prior application Serial No. filed
- were submitted to the International Bureau in PCT Application Number .
Receipt of the certified copies by the International Bureau in a timely manner under PCT Rule 17.1(a) has been acknowledged as evidenced by the attached PCT/IB/304.
- (A) Application Serial No.(s) were filed in prior application Serial No. filed ; and
- (B) Application Serial No.(s)
 - are submitted herewith
 - will be submitted prior to payment of the Final Fee

Respectfully Submitted,

OBLON, SPIVAK, McCLELLAND,
MAIER & NEUSTADT, P.C.

MARVIN J. SPIVAK

~~REGISTRATION NUMBER 24,913~~

Norman F. Oblon

Registration No. 24,618

Fourth Floor
1755 Jefferson Davis Highway
Arlington, Virginia 22202
Tel. (703) 413-3000
Fax. (703) 413-2220
(OSMMN 11/98)



РОССИЙСКОЕ АГЕНТСТВО ПО ПАТЕНТАМ И ТОВАРНЫМ ЗНАКАМ

(РОСПАТЕНТ)

ФЕДЕРАЛЬНЫЙ ИНСТИТУТ ПРОМЫШЛЕННОЙ СОБСТВЕННОСТИ

с511 У.С. РГО
09/466935



12/20/99

рег.№ 20/14-47

16 февраля 1999 г.

С П Р А В К А

Федеральный институт промышленной собственности Российского Агентства по патентам и товарным знакам настоящим удостоверяет, что приложенные материалы являются точным воспроизведением первоначального описания, формулы и чертежей (если имеются) заявки на выдачу патента на изобретение № 98123511, поданной в декабре месяце 23 дня 1998 года.

Название изобретения: Фрагмент ДНК rhtC, кодирующий синтез белка RhtC, придающего повышенную устойчивость к L- треонину бактериям *Escherichia coli*, и способ получения L-аминокислот.

Заявитель (и): Государственный научно-исследовательский институт генетики и селекции промышленных микроорганизмов (ГНИИгенетика).

Действительный авторы: ЛИВШИЦ Виталий Аркадьевич,
ЗАКАЕВА Наталья Павловна,
АЛЕШИН Владимир Веньяминович,
БЕЛАРЕВА Алла Валентиновна,
ТОКМАКОВА Ирина Львовна.



Уполномоченный заверить копию
заявки на изобретение

Г.Ф.Востриков
Заведующий отделом

98123511

МПК⁶ C12 N 1/20

C12 P 13/06

C12 P 13/08

ФРАГМЕНТ ДНК rhtC, КОДИРУЮЩИЙ СИНТЕЗ БЕЛКА RhtC, ПРИДАЮЩЕГО
ПОВЫШЕННУЮ УСТОЙЧИВОСТЬ К L-ТРЕОНИНУ БАКТЕРИЯМ ESCHERICHIA
COLI, И СПОСОБ ПОЛУЧЕНИЯ L-АМИНОКИСЛОТ

Настоящее изобретение относится к биотехнологии и, в частности, касается способа получения аминокислот, а именно L-гомосерина, L-тронина, L-валина, или L-лейцина с помощью бактерий, принадлежащих к роду Escherichia.

В качестве ближайшего аналога может быть рассмотрен фрагмент ДНК, кодирующий ген rhtA, связанный с устойчивостью бактерий к L-гомосерину и L-тронину на минимальной среде, а также полученные на основе использования мутации этого гена rhtA23 (ранее обозначавшейся как thrR) штаммы Escherichia coli, продуцирующие L-тронин (Авторское свидетельство СССР № 974817; Астаурова и др., Прикладная биохимия и микробиология, т.21, стр.611 – 616, 1985), или L-гомосерин и L-глутаминовую кислоту (Астаурова и др. Прикладная биохимия и микробиология, т. 27, стр. 556-561, 1991).

Ген rhtA дикого типа обеспечивает устойчивость к L-гомосерину и L-тронину, если он клонирован в мультикопийной плазмиде, и повышение его экспрессии повышает продукцию аминокислот бактериями, принадлежащими к роду Escherichia, и способными продуцировать L-тронин, L-лизин, L-валин, или L-аргинин. Было обнаружено, что мутация rhtA 23 расположена на 18 минуте карты хромосомы E.coli, а ген rhtA идентифицирован как orf1, открытая рамка считывания, локализующаяся между генами rexB и ompX. Генетическая структура, экспрессирующая белок,

кодируемый *orf1*, была обозначена как ген *rhtA* (*rht* – resistance to homoserine and threonine - устойчивость к гомосерину и треонину). Ген *rhtA* включает 5'-некодирующую область, в том числе SD-последовательность, саму открытую рамку считывания, *orf1*, и терминатор. Мутация *rhtA23* изменяет нуклеотид, непосредственно предшествующий инициаторному кодону ATG и повышает экспрессию гена *rhtA* (ABSTRACTS of 17th International Congress of Biochemistry and Molecular Biology in conjugation with 1997 Annual Meeting of the American Society for Biochemistry and Molecular Biology, San Francisco, California August 24-29, 1997, №457).

В процессе клонирования гена *rhtA* обнаружено, что существуют, по крайней мере, два участка на хромосоме *E. coli*, которые в мультикопийном состоянии сообщают клеткам устойчивость к L-гомосерину и L-треонину. Один из них – это ген *rhtA*. Как оказалось, другой ген, *rhtB*, сообщает клеткам *E. coli* устойчивость только к L-гомосерину (Заявка на выдачу патента в России. №. 98118425)

Задачей настоящего изобретения является повышение уровня накопления аминокислот клетками бактерий рода *Escherichia*, производящими L-гомосерин, L-треонин, L-валин или L-лейцин.

Поставленная задача решается получением фрагмента ДНК *rhtC*, кодирующего синтез белка *RhtC*, придающего повышенную устойчивость к L-треонину бактериям *E. coli*, и конструированием на его основе штаммов, позволяющих разработать способ получения аминокислот с повышенным выходом целевой аминокислоты.

Предметом настоящего изобретения являются:

1. Бактерии, принадлежащие к роду *Escherichia*, у которых устойчивость к L-треонину повышена вследствие увеличения в клетках бактерий активности белка, характеризующегося одним из двух свойств (А) или (Б):

А – белок, который состоит из аминокислотной последовательности № 2 (Фиг.2); или

Б – белок, который состоит из аминокислотной последовательности, включающей также делеции, замены, вставки или добавки из одной или нескольких аминокислот к последовательности №2 и который имеет активность обеспечивающую бактериям, содержащим этот белок, повышенную устойчивость к L-тронину;

2. Бактерии по п.1, у которых устойчивость к L-гомосерину повышена путем увеличения в клетках бактерий активности белка, характеризующегося одним из двух свойств (С) или (Д):

(С) –белок, который состоит из аминокислотной последовательности №.4 (Фиг.4); или
(Д) - белок, который состоит из аминокислотной последовательности, включающей также делеции, замены, вставки или добавки из одной или нескольких аминокислот к последовательности №4 и который имеет активность обеспечивающую бактериям, содержащим этот белок, устойчивость к L-гомосерину;

(3). Бактерии по п. (1) или (2) где активность белка, определяемого по свойствам (А) или (Б) повышена в результате трансформации бактерий с помощью ДНК, кодирующей белок, имеющий свойства. (А) или (Б);

(4). Бактерии по п. (2) где активность белка, имеющего свойства. (С) или (Д) повышена путем трансформации бактерий с помощью ДНК, кодирующей белок, имеющий свойства. (С) или (Д);

(5). Способ получения аминокислот, включающий этап культивирования бактерий, соответствующих любому из пунктов с 1 по 4, и обладающих способностью к продукции аминокислот, в культуральной среде, обеспечивающей продукцию и накопление соответствующей аминокислоты в этой среде, и выделения накопившейся аминокислоты из этой среды.

(6). Способ по п. 5, где аминокислота является одной из аминокислот в группе, состоящей из L-гомосерина, L-тронина, и аминокислот с разветвленной цепью;

(7). Способ по п. (6), где аминокислотами с разветвленной цепью являются L-валин или L-лейцин.

ДНК, кодирующая белок, определяемый выше по п. (А) или (Б) может рассматриваться как ген *rhtC*, а белок, кодируемый геном *rhtC* может рассматриваться как “белок *RhtC*”. ДНК, кодирующая белок, определяемый выше по п. (С) или (Д) может рассматриваться как ген *rhtB*, а белок, кодируемый геном *rhtB* может рассматриваться как “белок *RhtB*”. Активность белка *RhtC*, которая участвует в придании бактериям устойчивости к L-треонину (т.е. активность которая делает бактерии, имеющие белок *RhtC*, устойчивыми к L-треонину), может рассматриваться как «*Rt* активность» (от слов Resistance to threonine -устойчивость к треонину), а активность белка *RhtB* которая участвует в придании бактериям устойчивости к L-гомосерину (т.е. активность которая делает бактерии, имеющие белок *RhtB*, устойчивыми к L-гомосерину), может рассматриваться как «*Rh* активность» (от слов Resistance to homoserine -устойчивость к гомосерину),

Структурные гены, кодирующие белок *RhtC* и белок *RhtB* обозначены, соответственно, как «структурный ген *rhtC*» или. «структурный ген *rhtB*». Термин «повышение *Rt* активности или *Rh* активности» означает приданье клеткам устойчивости к L-треонину или L-гомосерину, или повышение этой устойчивости либо путем увеличения числа молекул белка *RhtC* или белка *RhtB*. или увеличением специфической активности этих белков, или нарушением негативной регуляции экспрессии или активности этих белков и т.п. Термин “ДНК, кодирующая белок”, обозначает двунитевую ДНК, одна из нитей которой кодирует белок. Устойчивость к L-треонину означает свойство бактерий расти на минимальной среде, содержащей L-треонин в концентрации, при которой штамм дикого типа, несущий природный аллель гена *rhtC*, не может расти, обычно это >30 мг/мл. Устойчивость к L-гомосерину означает свойство бактерий расти на минимальной среде, содержащей L-гомосерин в



концентрации, при которой штамм дикого типа, несущий природный аллель гена *rhtB*, не может расти, обычно это >5 мг/мл. Способность продуцировать аминокислоту означает свойство бактерий синтезировать и накапливать аминокислоту в культуральной среде в количестве большем, чем штаммы дикого типа.

В соответствии с настоящим изобретением устойчивость к высоким концентрациям L-тронина, или L-тронина и L-гомосерина может быть придана бактериям, принадлежащим к роду *Escherichia*, способным продуцировать аминокислоты, в частности, L-гомосерин, L-тронин, L-валин, или L-лейцин.

Настоящее изобретение представляет собой фрагмент ДНК (ген *rhtC*), кодирующий белок с Rt-активностью, и имеющий аминокислотную последовательность, представленную на фиг.2 (“Аминокислотная последовательность белка RhtC”). В частности, этот фрагмент может быть представлен нуклеотидной последовательностью включающей нуклеотиды от 187 по 804 в нуклеотидной последовательности №1 (см. формулу изобретения).

Второй фрагмент ДНК, используемый в настоящем изобретении, (ген *rhtB*), кодирующий белок с Rh-активностью, и имеющий аминокислотную последовательность, представленную на фиг.4 (“Аминокислотная последовательность белка RhtB”). В частности, этот фрагмент может быть представлен нуклеотидной последовательностью, включающей нуклеотиды от 557 по 1171 в нуклеотидной последовательности №3 (Фиг.3).

Ген *rhtB*, имеющий нуклеотидную последовательность, указанную в Последовательности №3, соответствует части последовательности, которая комплементарна последовательности M87049, имеющейся в базе данных GenBank и включает известную предполагаемую открытую рамку считывания f138 (нуклеотиды с 61959 по 61543 в последовательности M-87049), функция которой неизвестна, и которая расположена на хромосоме *E.coli* в районе 86,8 минуты карты, а также 201

нуклеотид проксимальнее f138. Необходимо отметить, что открытая рамка считывания f138 только со 160 5'-фланкирующими нуклеотидами не обеспечивает устойчивости к L-гомосерину. Оказалось также, что указанная последовательность выше f138 не содержит стоп-кодона в рамке f138. Кроме того, одному из ATG кодонов в этой последовательности предшествует участок связывания с рибосомами (SD-последовательность, нуклеотиды с 62171 по 62166 в M87049). Эта удлиненная открытая рамка считывания (нуклеотиды 62160-61546) и представляет собой структурный ген rhtB.

Ген rhtB получают либо путем инфицирования лизогенного по *Mucts* штамма *E.coli* лизатом фазмиды миниMu d50005, как это описано Грайсманом с соавт. (Groisman et al. J. Bacteriol., 158, 357-364, 1986) с последующим выделением плазмидной ДНК из колоний, выросших на минимальной среде, содержащей 40 мкг\мл канамицина и 10 мг\мл L-гомосерина, либо из хромосомы *E.coli* путем гибридизации колоний, или с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР) (White et al., Trends Genet., 5, ,185, 1989), используя олигонуклеотид(ы), имеющие последовательность, соответствующую участку в районе 86 минуты хромосомы *E.coli*.

Другой подход предполагает синтез олигонуклеотида на основе последовательности №3. Используя олигонуклеотиды, имеющие последовательность, соответствующую участку ДНК, который расположен проксимальнее нуклеотида №.557, и участку ДНК, который расположен дистальнее нуклеотида №.1171 в последовательности № 3 в качестве праймеров для ПЦР, можно амплифицировать всю кодирующую область.

Синтез олигонуклеотидов осуществляют обычным методом, например с помощью фосфоамидитного метода (см. Tetrahedron Letters, 22, 1859, 1981), с использованием коммерческого ДНК-синтезатора (например, ДНК синтезатора модели 380B, производимого Applied Biosystems). ПЦР осуществляют с использованием

комерчески доступных аппаратов для ПЦР (например, ДНК-термоциклира, модель PG 2000, производимого компанией Takara Shuzo Co., Ltd) с применением Таq ДНК полимеразы в соответствии с методикой, описанной поставщиком фермента.

Ген *rhtC* соответствует уточненной, как это описано ниже, последовательности o128 (нуклеотиды №.60860 – 61480 в последовательности M87049, имеющейся в базе данных GenBank) которая расположена на участке хромосомы, прилежащем к гену *rhtB*. Его получают одновременно с геном *rhtB*, как это показано в примере 1, путем инфицирования лизогенного по *Mucts* штамма *E.coli* лизатом фазмиды миниMi d50005, как это описано выше, с последующим выделением плазмидной ДНК из колоний, выросших на минимальной среде, содержащей 40 мкг/мл канамицина и 50 мг/мл треонина. Другой подход предполагает синтез олигонуклеотидов на основе последовательности №1 описанным выше методом и использования их для гибридизации или в ПЦР. Используя олигонуклеотиды, имеющие последовательность, соответствующую участку ДНК, который расположен проксимальнее нуклеотида №.187, и участку ДНК, который расположен дистальнее нуклеотида №.804 в последовательности № 1 в качестве праймеров для ПЦР, можно амплифицировать всю кодирующую область.

ДНК, кодирующая белок RhtB по настоящему изобретению, может кодировать белок RhtB включая делеции, замены, инсерции или добавки одной или нескольких аминокислот в одной или нескольких позициях, не нарушающих при этом Rht-активность белка RhtB. Точно так же, ДНК, кодирующая белок RhtC по настоящему изобретению, может кодировать белок RhtC включая делеции, замены, инсерции или добавки одной или нескольких аминокислот в одной или нескольких позициях, не нарушающих при этом Rht-активность белка RhtC.

ДНК, кодирующая по существу тот же белок, что и RhtB, или тот же белок что и RhtC, описанные выше, может быть получена, например, путем модификации

нуклеотидной последовательности, в частности при помощи сайт-направленного мутагенеза, так что один или более аминокислотный остаток будет делециирован, заменен, вставлен или добавлен. ДНК, модифицированная описанным выше способом, может быть получена известными методами с помощью мутационных воздействий. Мутационная обработка включает методы обработки ДНК, кодирующей белок RhtB или белок RhtC, *in vitro*, например, при помощи гидроксиламина, или методы обработки микроорганизма, в частности, бактерий, принадлежащих к роду *Escherichia* и несущих ДНК, кодирующую белок RhtB или белок RhtC, УФ облучением или мутагенными агентами, такими как N-метил-N'-нитро-N-нитрозогуанидин (НГ) или азотистая кислота, которые обычно используется для индукции мутаций.

ДНК, кодирующую указанные варианты белка RhtB или RhtC, отбирают путем экспрессии плазмидной ДНК, несущей гены *rhtC* или *rhtB* и подвергнутой *in vitro* мутагенному воздействию, как описано выше, в соответствующих клетках с последующим определением их устойчивости к L- треонину или L-гомосерину и отбором ДНК, которая обеспечивает эту устойчивость. Изобретение относится также к вариантам белка RhtC, которые встречаются в разных видах, штаммах и вариантах бактерий рода *Escherichia* и обусловлены природным разнообразием. ДНК, кодирующие эти варианты, и гибридизуются в жестких условиях с ДНК, имеющей нуклеотидную последовательность от нуклеотида 187 по 804 нуклеотид в последовательности №1.

Аналогичным образом, изобретение относится также к вариантам белка RhtB, которые встречаются в разных видах, штаммах и вариантах бактерий рода *Escherichia* и обусловлены природным разнообразием. ДНК, кодирующие эти варианты, и гибридизуются в жестких условиях с ДНК, имеющей нуклеотидную последовательность от нуклеотида 557 по 1171 нуклеотид в последовательности №3. Термин «жесткие условия» означает здесь условия, при которых так называемая

специфическая гибридизация происходит, а неспецифическая не происходит. Трудно четко выразить эти условия с помощью каких-то цифровых значений, однако например, жесткие условия включают условия, при которых ДНК, имеющие высокую гомологию, например, не менее 70% гомологии по отношению друг к другу - гибридизуются, а ДНК, имеющие гомологию ниже указанной – нет.

В настоящем изобретении рассматривают бактерии, принадлежащие к роду *Escherichia*, представленные здесь *E.coli*, у которых Rt активность повышена. Кроме того, настоящее изобретение включает бактерии *E. coli*, у которых также повышена Rh-активность.

Повышение Rt-активности происходит, например, за счет амплификации числа копий структурного гена *rhtC* в клетках при трансформации их рекомбинантной ДНК, в которую включен фрагмент, содержащий структурный ген *rhtC*, кодирующий белок RhtC, лигированный с промоторной последовательностью, которая эффективно функционирует в бактериях рода *Escherichia*. Rt-активность может быть также повышена в результате замены промоторной последовательности гена *rhtC* на хромосоме промоторной последовательностью, которая более эффективно функционирует в бактериях рода *Escherichia*.

Повышение Rh-активности происходит, например, за счет амплификации числа копий структурного гена *rhtB* в клетках при трансформации их рекомбинантной ДНК, в которую включен фрагмент, содержащий структурный ген *rhtB*, кодирующий белок RhtB, лигированный с промоторной последовательностью, которая эффективно функционирует в бактериях рода *Escherichia*. Rh-активность может быть также повышена в результате замены промоторной последовательности гена *rhtB* на хромосоме промоторной последовательностью, которая более эффективно функционирует в бактериях рода *Escherichia*.

Амплификация числа копий структурного гена *rhtC*, или структурного гена *rhtB* в клетках может быть осуществлена также путем введения мультикопийного вектора, который несет структурный ген *rhtC* или структурный ген *rhtB*, в клетки бактерий, принадлежащих к роду *Escherichia*. В частности, число копий может быть увеличено путем введения плазмида, фага или транспозона (Berg, D.E. and Berg, C.M., Bio/Technol., 1, 417, 1983), содержащих структурный ген *rhtC* или структурный ген *rhtB*, в клетки бактерий, принадлежащих к роду *Escherichia*. Мультикопийные вектора могут представлены плазмидными векторами, такими как pBR322, pMW118, pUC19 или подобными, или фаговыми векторами, такими как λ 1059, λ BF 101, m13MP9 или подобными. Транспозоны могут быть представлены фагом *Mu*, транспозонами *Tn10*, *Tn5* или подобными. Введение ДНК в бактерии, принадлежащие к роду *Escherichia*, может быть осуществлено, например, с помощью метода Моррисона (Methods in Enzymology., 68, 326, 1979) или метода, в котором реципиентные клетки бактерий подвергают воздействия хлористого кальция для увеличения их проницаемости по отношению к ДНК (Mandel and Higa, J. Mol. Biol., 53, 159, 1970) или другими подобными методами.

Обнаруженную связь между повышением *Rt*-активности, а также одновременным повышением *Rt*-активности и *Rh*-активности и способностью бактерий рода *Escherichia* увеличивать продукцию L-аминокислот изобретатели используют для получения штаммов, обладающих повышенной продуктивностью аминокислот. При этом возможны два варианта:

1. Признак повышенной *Rt*-активности, или одновременно повышенной *Rt*-активности и *Rh* активности, вводят в штаммы, уже способные продуцировать желаемые аминокислоты.
2. Способность к продукции аминокислот придается штаммам, у которых повышена *Rt*-активность или одновременно повышены *Rt*-активность и *Rh*-активность.

Сконструированные на основе амплификации фрагмента ДНК *rhtC* штамм *E. coli* MG442/pRhtC – продуцент гомосерина, штамм *E. coli* MG442/pVIC40, pRhtC – продуцент треонина и штаммы *E. coli* NZ10/pRhtBC и *E. coli* NZ10/pRhtB, pRhtC – продуценты гомосерина, валина и лейцина способны к повышенной продукции указанных аминокислот по сравнению со штаммами, не содержащими амплифицированного фрагмента ДНК *rhtC*.

Новые штаммы депонированы во Всероссийской коллекции промышленных микроорганизмов. Штамм *E. coli* MG442/pRhtC депонирован под номером ВКПМ В-7700; штамм *E. coli* MG442/pVIC40, pRhtC депонирован под номером ВКПМ В-7680; штамм *E. coli* NZ10/pRhtB, pRhtC депонирован под номером ВКПМ В-7681 и штамм *E. coli* NZ10/pRhtBC депонирован под номером ВКПМ В-7682.

Штамм *E. coli* MG442/pRhtC (ВКПМ В-7700) имеет следующие культурально-морфологические и биохимические признаки.

Морфология клеток. Грамотрицательные слабоподвижные палочки с закругленными концами, 1,5-2,0 мкм в длину.

Культуральные признаки.

Мясо-пептонный агар. Через 24 часа роста при 37° С образует круглые беловатые полупрозрачные колонии диаметром 1,5 - 3,0 мм; поверхность колоний гладкая, края ровные или слегка волнистые, центр колоний приподнят, структура однородная, консистенция пастообразная, легко эмульгируется.

Агар Лурия. Через 24 ч роста при 37° С образует колонии образует беловатые полупрозрачные колонии диаметром 1,5 - 2,5 мм; поверхность колоний гладкая, края ровные, структура однородная, консистенция пастообразная, легко эмульгируется.

Агаризованная Среда Адамса.

Через 40 - 48 ч роста при 37° С образует колонии диаметром 0,5 - 1,5 мм; серовато-белые полупрозрачные, слегка выпуклые с блестящей поверхностью. В присутствии L-

изолейцина (0,1-0,5 г/л) рост стимулируется и аналогичные колонии образуются через 18-20 ч.

Рост в мясо-пептонном бульоне. После 24 ч роста - сильное равномерное помутнение, характерный запах.

Физиолого-биохимические признаки.

Рост по уколу в мясо-пептонном агаре. Хороший рост по всему уколу. Микроорганизм является факультативным анаэробом.

Желатину не разжижает.

Рост на молоке хороший с коагуляцией молока.

Индол не образует.

Отношение к температуре. Растет на мясо-пептонном бульоне при температурах 20 – 42° С. Оптимальной температурой для роста является температура 33- 37° С.

Отношение к pH среды. Растет на средах с pH от 6,0 до 8,0. Оптимальное значение pH - 7,2.

Отношение к источникам углерода. Хорошо растет на глюкозе, фруктозе, лактозе, маннозе, галактозе, ксилозе, глицерине, манните с образованием кислоты и газа.

Отношение к источникам азота. Усваивает азот в форме аммония, нитратов, а также азот некоторых органических соединений.

Устойчив к ампициллину.

Содержание плазмид. Клетки содержат многокопийную гибридную плазмиду pRhtC, несущую ген rhtC, сообщающий клеткам устойчивость к L-треонину (50 мг/мл) и детерминант устойчивости к ампициллину.

Штамм *E. coli* MG442/pVIC40, pRhtC (ВКПМ В-7680) имеет те же культурально-морфологические и биохимические признаки что и штамм ВКПМ В-7700 (MG442/pRhtC), за исключением того, что он наряду с плазмидой pRhtC содержит многокопийную гибридную плазмиду pVIC40, несущую гены треонинового оперона и

детерминант устойчивости к стрептомицину. Штамм устойчив к ампициллину и стрептомицину.

Штамм *E. coli* NZ10/pRhtB, pRhtC (ВКПМ В-7681) имеет те же культурально-морфологические и биохимические признаки что и штамм ВКПМ В-7700 (MG442, pRhtC), за исключением того, что он нуждается для роста в L-тронине (0.1-5 мг/мл), рост его не стимулируется L-изолейцином, и он содержит многокопийную плазмиду pRhtB несущую ген rhtB, сообщающий клеткам устойчивость к L-гомосерину (10 мг/мл) и детерминант устойчивости к канамицину. Штамм устойчив к канамицину и ампициллину.

Штамм *E. coli* NZ10/pRhtBC (ВКПМ В-7682) имеет те же культурально-морфологические и биохимические признаки что и штамм ВКПМ В-7681 (NZ10/pRhtB, pRhtC), за исключением того, что он содержит многокопийную плазмиду pRhtBC несущую одновременно гены rhtB и rhtC, а также детерминант устойчивости к ампициллину. Штамм устойчив к ампициллину.

Способ получения аминокислот культивированием штаммов-продуцентов осуществляют следующим образом.

Аминокислоту получают путем культивирования бактерий, у которых Rt активность, или одновременно Rt-активность и Rh-активность повышенны, например, путем амплификации числа копий гена rhtC или rhtB, как описано выше, и которые обладают способностью к продукции аминокислоты при культивировании их в культуральной среде, где происходит накопление аминокислоты, с последующем выделением этой аминокислоты из среды (культуральной жидкости). Аминокислота представлена преимущественно L-гомосерином, L- тронином, L- аланином, L-валином или L-лейцином. В соответствии с настоящим изобретением, культивирование бактерий, принадлежащих к роду *Escherichia*, выделение и очистку аминокислоты из культуральной жидкости осуществляют известными методами. Для культивирования

используют синтетическую или натуральную среду. Такая среда включает источник углерода, азота, минеральные соли и необходимые добавки в количествах, оптимальных для роста и биосинтеза. В качестве источника углерода используют различные углеводы, такие как глюкоза, сахароза, различные органические кислоты. В зависимости от ассимилирующих способностей можно применять спирты, включая этанол или глицерол. В качестве источника азота используют аммиак, различные соли аммония, такие как сульфат аммония, или другие азотсодержащие соединения, такие как амины, а также природные источники азота, такие как пептон. гидролизат соевых бобов, или гидролизат микробных клеток. В качестве минеральных компонентов используются фосфат калия однозамещенный, сульфат магнезии, хлористый натрий, сульфат железа, сульфат марганца, карбонат кальция. Культивирование преимущественно осуществляют в аэробных условиях, таких как культивирование на мешалке, или с аэрацией и перемешиванием культуры. Температура культивирования - от 30° до 40° С, преимущественно 30-38° С. pH культуры - 5-9, преимущественно 6,5-7,2. pH культуры доводят до желаемых значений с помощью аммония, карбоната кальция, различных кислот, оснований или буферов. Культивирование осуществляют в течение 1-3 дней. После завершения культивирования выделение аминокислоты осуществляют путем удаления твердых частиц, таких как клетки, из среды с помощью центрифугирования или фильтрации через мембранные фильтры с последующим выделением и очисткой целевой аминокислоты с помощью ионообменника, фракционирования с помощью концентрации и кристаллизации.

Перечень фигур.

Фиг.1. Клонирование и идентификация гена *rhtB* и гена *rhtC*.

Фиг.2. Аминокислотная последовательность белка RhtC (последовательность №2).

Фиг.3. Нуклеотидная последовательность, содержащая ген *rhtB*
(последовательность №3)

Фиг.4. Аминокислотная последовательность белка *RhtB* (последовательность №4).

Фиг.5. Структура плазмида *pRhtB*, несущей ген *rhtB*.

Фиг.6. Структура плазмида *pRhtC*, несущей ген *rhtC*.

Фиг.7. Структура плазмида *pRhtBC*, несущей гены *rhtB* и *rhtC*.

Настоящее изобретение более конкретно поясняют нижеследующие примеры.

Пример 1. Получение фрагментов ДНК *rhtB* и *rhtC*

Этап 1. Клонирование генов, связанных с устойчивостью к L- треонину и L-гомосерину, на фазмиде миниMu.

Гены, связанные с устойчивостью к L- треонину и L-гомосерину, клонируют *in vivo* на фазмиде мини Mu (Groisman et al. J.Bacteriol., 168, 357-364, 1986). В качестве донора используют штамм MG442, лизогенизированный Mu *cts62*. Клетки заражают фагом миниMu d5005, индуцируют профаг, полученным фаголизатом инфицируют клетки штамма ВКПМ-513 Mu *cts62* (Hfr K10 metB) и высевают на минимальную среду с метионином (50 мкг/мл), L-гомосерином (10 мг/мл) и канамицином (40 мкг/мл) и культивируют при 30°С. Из выросших через 48 часов колоний выделяют плазмидную ДНК, которой трансформируют штамм *E. coli* ВКПМ В-513 по стандартной методике. Трансформанты отбирают на чашках с L-агаром и канамицином (40 мкг/мл). Из трансформантов, которые устойчивы к L-гомосерину, выделяют плазмидную ДНК, которую анализируют с помощью рестриктного анализа. Из донорного штамма были отклонированы вставки (фрагменты ДНК), принадлежащие к двум разным областям хромосомы. Таким образом, на хромосоме *E. coli* обнаружено, по крайней мере, два

гена, которые при амплификации сообщают клеткам *E. coli* устойчивость к L-гомосерину. Один тип вставок содержит ген *rhtA*, о котором уже сообщалось (ABSTRACTS of 17th International Congress of Biochemistry and Molecular Biology in conjunction with 1997 Annual Meeting of the American Society for Biochemistry and Molecular Biology, San Francisco, California August 24-29, 1997). Второй тип вставок содержит фрагмент *SacII-SacII*, сообщающий устойчивость к L-гомосерину и к L-треонину, или минимальный фрагмент *MluI-MluI* длиной 0,8 kb, сообщающий устойчивость только к L-гомосерину (фиг. 1).

Этап 2: Идентификация генов *rhtB* и *rhtC*.

Полученный *MluI-MluI* фрагмент секвенируют по двум цепям по методу Сенгера (Sanger et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 74, 5463, 1977) и выясняют, что он включает открытую рамку считывания f138 (с 61959 по 61543 нуклеотид в последовательности M87049, GenBank) и 201 нуклеотид, расположенный перед ней. Вставка, содержащая открытую рамку считывания f138 только со 160 5'-фланкирующими нуклеотидами не обеспечивает устойчивости к L-гомосерину. Указанная последовательность выше f138 не содержит стоп-кодона в рамке f138. Кроме того, одному из ATG кодонов в этой последовательности предшествует участок связывания с рибосомами (SD-последовательность, нуклеотиды с 62171 по 62166 в M87049). Эта удлинненная открытая рамка считывания (нуклеотиды 62160-61546) представляет собой структурный ген *rhtB*. Кодируемый им белок RhtB (Фиг.4.) является сильно гидрофобным белком и содержит потенциальные трансмембранные сегменты.

Плазмида, содержащая ген *rhtB*, сообщает клеткам устойчивость только к высоким концентрациям гомосерина (Фиг.1). В тоже время фрагмент ДНК *SacII-SacII*, сообщающий клеткам одновременно устойчивость к высоким концентрациям гомосерина и треонина, содержит вторую неидентифицированную открытую рамку считывания, o128. Субклонирование o128 на минимальном фрагменте *ClaI-Eco47III*

показывает, что плазмида, несущая этот ген, сообщает клеткам устойчивость только к высоким (50 мг/мл) концентрациям L-треонина (Фиг.1). Субклонированный фрагмент был секвенирован и оказалось, что он содержит дополнительный нуклеотид (G) в положении между нуклеотидами 61213 и 61214 последовательности M87049. Добавление этого нуклеотида к указанной последовательности элиминирует сдвиг рамки считывания и удлиняет открытую рамку считывания в направлении 5'-фланкирующей области до 60860 нуклеотида, включительно. Этот новый ген (нуклеотиды № 60860-61480 в M87049) обозначен как *rhtC*. Оба гена, *rhtB* и *rhtC*, кодируют белки, гомологичные транспортеру, связанному с транспортом лизина из клеток *Corynebacterium glutamicum*.

Пример 2. Влияние амплификации гена *rhtB*, или гена *rhtC* на продукцию L-гомосерина.

<1> Конструирование L-гомосерин-продуцирующего штамма *E. coli* NZ10/pAL4, pRhtB (ВКПМ B-7658) и получение L-гомосерина с его помощью.

Фрагмент ДНК *rhtB* клонируют в многокопийный плазмидный вектор pUK21 (Vieira, Messing, Gene, 100, 189-194, 1991). В результате получают плазмиду pRhtB (Фиг. 5).

Штамм *E.coli* NZ10, который является *Leu⁺* ревертантом известного штамма C600 (*thrB, leuB*) (Appleyard, Genetics., 39, 440-452, 1954), трансформируют плазмидой pAL4, которая представляет собой вектор pBR322, несущий ген *thrA*, кодирующий аспартокиназу-гомосериндегидрогеназу I. В результате получают штамм *E.coli* NZ10/pAL4, способный к продукции L-гомосерина. Полученный штамм трансформируют плазмидой pRhtB или вектором pUK21 и в результате получают штаммы *E. coli* NZ10/pAL4, pRhtB (ВКПМ B-7658) и *E. coli* NZ10/pAL4, pUK21 (ВКПМ B-7661). Штамм *E. coli* NZ10/pAL4, pRhtB сообщает клеткам устойчивость к высокой

концентрации гомосерина (10 мг/мл), к которой штамм *E. coli* NZ10/pAL4, pUK21 остается чувствительным. Каждый из полученных штаммов культивируют при 37 С в течение 18 часов в бульоне LB (Миллер, Дж. Эксперименты в молекулярной генетике. Москва "Мир", 1976. Стр.395) содержащем 50 мг/л канамицина и 100 мг/мл ампицилина. По 0.3 мл полученной культуральной жидкости вносят в 3 мл ферментационной среды, имеющей состав, указанный ниже, и содержащей 50 мг/мл канамицина и 100 мг/мл ампицилина, содержащейся в пробирках 20 x 200 мм, и культивируют при 37 С 46 часов на роторной качалке.

Состав ферментационной среды (г/л):

Глюкоза	80
(NH ₄) ₂ SO ₄	22
K ₂ HPO ₄	2
NaCl	0.8
MgSO ₄ x 7H ₂ O	0.8
FeSO ₄ x 7H ₂ O	0.02
MnSO ₄ x 5H ₂ O	0.02
Тиамин HCl	0,0002
Дрожжевой экстракт	1,0
CaCO ₃	30 (добавляют после стерилизации)

Таблица 1

Штамм <i>E. coli</i>	OD ₅₆₀	Накопление гомосерина (г/л)
NZ10/pAL4, pUK21	14.3	3,3
NZ10/pAL4, pRhtB	15.6	6,4

После культивирования определяют количество накопившегося в среде L-гомосерина и оптическую плотность культуральной жидкости при 560 нм известными

методами. Как показано в табл. 1., штамм NZ10/pAL4, pRhtB накапливает L-гомосерин в большем количестве, чем штамм NZ10/pAL4, pUC21, в котором число копий гена rhtB не увеличено.

<2> Конструирование L-гомосерин-продуцирующего штамма E. coli MG442, pRhtC (ВКПМ В-7700) и получение L-гомосерина с его помощью.

Фрагмент ДНК rhtC клонируют в многокопийный плазмидный вектор pUC21 (Vieira, Messing, Gene, 100, 189-194, 1991). В результате получают плазмиду pRhtC (Фиг. 6).

Известный штамм E.coli MG442 (Гусятинер и др., 1978, Генетика, 14, 947-956) трансформируют плазмидой pRhtC или вектором pUC21 и в результате получают штаммы E. coli MG442/pRhtC (ВКПМ В-7700) и E. coli MG442/pUC21. Штамм E. coli MG442/pRhtC обладает устойчивостью к высокой концентрации треонина (50мг/мл), к которой штамм E. coli MG442/pUC21 остается чувствительным.

Каждый из полученных таким образом штаммов культивируют при 37°C 18 часов в LB бульоне с 100 мг/л ампициллина. Затем по 0.3 мл полученной культуральной жидкости вносят в пробирки 20 x 200мм с 3 мл ферментационной среды, описанной выше, содержащей 100 мг/л ампициллина, и культивировали при 37С 72 часа на роторной качалке. После культивирования количество накопленного в среде L-гомосерина, а также оптическую плотность культуральной жидкости при 560 нм измеряют известными методами. Результаты представлены в табл.2.

Как показано в табл. 2, штамм MG442 после введения в него плазмиды pRhtC из продуцента треонина превращается в продуцент гомосерина и накапливает этой аминокислоты больше, чем штамм MG442/pUC21, в котором число копий гена rhtC не увеличено.

Таблица 2

Штамм E. coli	OD ₅₆₀	Накопление L-гомосерина (г/л)
MG422/pUC21	9.7	<0.1
MG422/pRhtC	15.2	9.5

Пример 3. Влияние амплификации гена rhtB или гена rhtC на продукцию L-тронина.

<1> Конструирование штамма-продуцента L-тронина E. coli MG442/pVIC40, pRhtB (ВКПМ В-7660) и получение L-тронина с его помощью.

Для получения нового штамма-продуцента L-тронина E. coli MG442/pVIC40, pRhtB в качестве реципиента используют штамм E. coli MG442 (см. Пример 2). Этот штамм трансформируют известной плазмидой pVIC40 (Патент США 5,175, 107, 1992). Трансформанты отбирают на чашках с LB агаром, содержащем 100 мг/л стрептомицина и получают штамм MG442/pVIC40. Штамм MG442/pVIC40 трансформируют плазмидами pRhtB или pUK21 и получают штаммы MG442/pVIC40, pRhtB (ВКПМ В-7660) и MG442/pVIC40, pUK21 (ВКПМ В- 7663).. Штамм E.coli MG442/pVIC40, pRhtB обладает устойчивостью к высокой концентрации гомосерина (10мг/мл) к которой штамм E. coli MG442/pUC21 остается чувствительным.

Каждый из этих штаммов культивируют при 37°C 18 часов в LB бульоне как в примере 2 с 50 мг/л канамицина и 100 мг/л стрептомицина. Затем 0,3 мл полученной культуральной жидкости вносят в пробирки 20 x 200 мм с 3 мл ферментационной среды, описанной в примере 2, содержащей 50 мг/л канамицина и 100 мг/л стрептомицина. и культивируют при 37°C 46 часов на роторной качалке. После культивирования количество накопившегося в среде L-тронина и оптическую плотность культур при 560 нм измеряют известными способами. Результаты представлены в табл.3.

Таблица 3

Штамм E. coli	OD560	Накопление L-треонина, г/л
MG442/pVIC40, pUK21	16.3	12.9
MG442/pVIC40, pRhtB	15.2	16.3

Как показано, в табл. 3, штамм MG442/pVIC40, pRhtB накапливает L-треонин в большем количестве чем штамм MG442/pVIC40, pUK21, у которого число копий гена rhtB не увеличено.

<2> Конструирование штамма- продуцента L-треонина E. coli MG442/pVIC40, pRhtC (ВКПМ В-7680) и получение L-треонина с его помощью.

Штамм MG442/pVIC40 трансформируют плазмидами pRhtC или pUC21 и получают штаммы MG442/pVIC40, pRhtC (ВКПМ В-76800) и MG442/pVIC40, pUC21.

Штамм MG442/pVIC40, pRhtC обладает устойчивостью к высокой концентрации треонина (50мг/мл) к которой штамм E. coli MG442/pVIC40, pUC21 остается чувствительным.

Каждый из этих штаммов культивируют при 37°C 18 часов в LB бульоне как в примере 2 со 100 мг/л ампициллина и 100 мг/л стрептомицина. Затем 0,3 мл полученной культуральной жидкости вносят в пробирки 20 x 200 мм с 3 мл ферментационной среды, описанной в примере 2, содержащей 100 мг/л ампициллина и 100 мг/л стрептомицина, и культивируют при 37°C 46 часов на роторной качалке. После культивирования количество накопившегося в среде L-треонина и оптическую плотность культур при 560 нм измеряют известными способами. Результаты представлены в табл.4.

Таблица 4

Штамм E. coli	OD560	Накопление L- треонина, г/л
MG442/pVIC40, pUC21	17.4	4.9
MG442/pVIC40, pRhtC	15.1	10.2

Как показано, в табл. 4, штамм MG442/pVIC40, pRhtC накапливает L- треонин в большем количестве чем штамм MG442/pVIC40, pUC21, у которого число копий гена rhtC не увеличено.

Пример 4. Влияние совместной амплификации гена rhtB и гена rhtC на продукцию аминокислот.

Фрагмент ДНК SacII-SacII, содержащий одновременно гены rhtB и rhtC, клонируют в многокопийный плазмидный вектор pUC21 (Vieira, Messing, Gene, 100, 189-194, 1991). В результате получают плазмиду pRhtBC (Фиг.1, Фиг. 7).

Штамм E.coli NZ10 трансформируют вектором pUC21 или плазмидами pRhtB, pRhtC, pRhtBC и в результате получают штаммы E. coli NZ10/pUC21 (ВКПМ В-7685), E. coli NZ10/ pRhtB (ВКПМ В-7683), E. coli NZ10/ pRhtC (ВКПМ В-7684), E. coli NZ10/pRhtB, pRhtC (ВКПМ В-7681) и E. coli NZ10/pRhtBC (ВКПМ В-7682). Штамм E. coli NZ10/ pRhtB обладает повышенной устойчивостью к высокой концентрации гомосерина (10мг/мл), штамм . E. coli NZ10/pRhtC обладает повышенной устойчивостью к L- треонину (50 мг/мл) а штаммы E. coli NZ10/ pRhtB, pRhtC и E. coli NZ10/ pRhtBC обладают одновременно повышенной устойчивостью к высокой концентрации гомосерина (10мг/мл) и треонина (50 мг/мл), к которым штамм E. coli NZ10/pUC21 остается чувствительным.

Каждый из полученных штаммов культивируют, как описано выше, внося в посевную и ферментационную среду соответствующие антибиотики. После

культивирования в течение 46 часов количество накопившихся в среде аминокислот и оптическую плотность культур при 560 нм измеряют известными способами.

Результаты представлены в табл. 5

Таблица 5.

Штамм	OD ₅₆₀	Гомосерин (г/л)	Валин (г/л)	Лейцин (г/л)
NZ10/pUC21	18.7	0.6	0.22	0.16
NZ10/pRhtB	19.6	2.3	0.21	0.14
NZ10/pRhtC	20.1	1.7	0.20	0.15
NZ10/pRhtBC	21.8	4.2	0.34	0.44
NZ10/pRhtB,pRhtC	19.2	4.4	0.35	0.45

Как показано, в табл. 5, одновременная амплификация генов *rhtB* и *rhtC* в клетках штамма NZ10 повышает накопление в культуральной жидкости L-гомосерина, L-валина и L-лейцина. Этот результат показывает что в клетках продукты генов *rhtB* и *rhtC* могут между собой взаимодействовать.

Пример 5 Влияние амплификации гена *rhtB* и гена *rhtC* на устойчивость бактерий *E.coli* к некоторым аминокислотам и аналогам аминокислот.

Как показано выше, плазмиды, несущие гены *rhtB* и *rhtC* оказывают положительное влияние на накопление некоторых аминокислот в культуральной жидкости различными штаммами-продуцентами. Оказалось также что характер накапливаемых аминокислот зависит от генотипа штамма. Гомология продуктов генов *rhtB* и *rhtC* с лизиновым транспортером *LysE*, осуществляющим экспорт L-лизина из клеток *Corynebacterium glutamicum* (Vrljic et al., Mol. Microbiol., 22, 815-826, 1996), указывает на аналогичную функцию белков *RhtB* и *RhtC*. Известно, что повышение активности генов, контролирующих транспорт из клеток различных

ингибиторов роста, увеличивает их устойчивость к соответствующим соединениям. В связи с этим определяют влияние плазмид pRhtB и pRhtC на устойчивость штамма *E. coli* N99, который является Str^R мутантом известного штамма W3350 (ВКПМ В-1557), к некоторым аминокислотам и аналогам аминокислот. С этой целью штамм N99 трансформируют плазмидами pRhtB, pRhtC и векторами pUC21 и pUK21. Ночные культуры полученных штаммов N99/pRhtB, N99/pRhtC, N99/pUK21 и N99/pUC21, выращенные в минимальной среде M9 на качалке (около 10^9 клеток/мл) разводят 1:100 и подращивают в течение 5 часов в той же среде. Затем полученные культуры в логарифмической фазе роста разводят и приблизительно по 10^4 жизнеспособных клеток наносят на высушенные чашки с агаризованной (2% агара) средой M9, содержащей различные концентрации аминокислот, или аналогов аминокислот. Рост или отсутствие роста определяют через 46-48 часов. Таким образом устанавливают минимальные ингибирующие концентрации (МИК) этих соединений (Табл. 6).

Таблица 6

Соединение	МИК (мкг/мл)		
	N99/pUC21*	N99/pRhtB	N99/pRhtC
L-гомосерин	1000	20000	1000
L- треонин	30000	40000	80000
L-валин	0,5	0,5	2,0
L-гистидин	5000	5000	40000
AOB	100	2000	15000
АЭЦ	5	20	5
4-аза-DL-лейцин	50	100	50
O-метил-L- треонин	20	20	20

* Те же данные были получены и для штамма N99/pUK21.

Как видно из таблицы, амплификация гена *rhtB* существенно повышает устойчивость бактерий не только к гомосерину, но и к аналогу треонина, α -амино- β -оксивалериановой кислоте (АОВ), в меньшей степени возрастает устойчивость к L-тронину и к аналогу L-лизина, (S)-2-аминоэтил-L-цистеину (АЭЦ).. Кроме того, наблюдается некоторое увеличение резистентности бактерий к аналогу лейцина, 4-аза-DL-лейцину. Амплификация гена *rhtC* кроме L-тронина существенно повышает устойчивость бактерий к АОВ, L-гистидину и L-валину. Эти результаты свидетельствуют о том, что каждый из предполагаемых транспортеров, *RhtB* и *RhtC*, обладают специфичностью по отношению к нескольким субстратам (аминокислотам) или может обнаруживать неспецифический эффект в результате амплификации.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

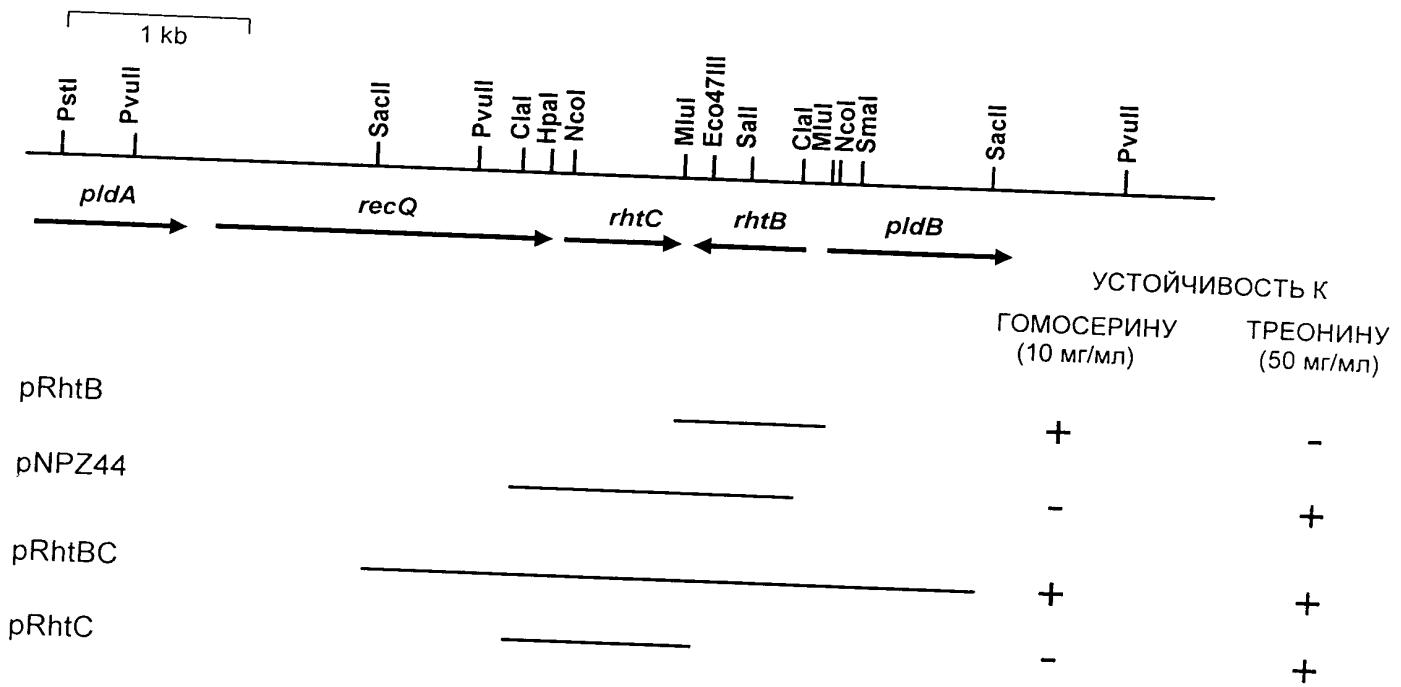
1. Фрагмент ДНК rhtC, кодирующий синтез белка RhtC, придающего повышенную устойчивость к L-тронину бактериям Escherichia coli, содержащий регуляторные элементы гена rhtC и структурную часть гена rhtC и имеющий следующую нуклеотидную последовательность (последовательность №.1):

atgccgatca ccggccagcga aatgctcagc gttaacggcg ttggatgcg caagctggaa	60
cgctttggca aaccgttat ggcgctgatt cgtgcgcatg ttgatggcga tgacgaagag	120
tagtcagcag cataaaaaag tgccagtatg aagactccgt aaacgtttcc cccgcgagtc	180
aaatgt atg ttg atg tta ctc acc gtc gcc atg gtg cac att gtg	228
Met Leu Met Leu Phe Leu Thr Val Ala Met Val His Ile Val	
1 5 10	
gcg ctt atg agc ccc ggt ccc gat ttc ttt ttt gtc tct cag acc gct	276
Ala Leu Met Ser Pro Gly Pro Asp Phe Phe Val Ser Gln Thr Ala	
15 20 25 30	
gtc agt cgt tcc cgt aaa gaa gcg atg atg ggc gtg ctg ggc att acc	324
Val Ser Arg Ser Arg Lys Glu Ala Met Met Gly Val Leu Gly Ile Thr	
35 40 45	
tgc ggc gta atg gtt tgg gct ggg att ggc ctg ctt ggc ctg cat ttg	372
Cys Gly Val Met Val Trp Ala Gly Ile Ala Leu Leu Gly Leu His Leu	
50 55 60	
att atc gaa aaa atg gcc tgg ctg cat acg ctg att atg gtg ggc ggt	420
Ile Ile Glu Lys Met Ala Trp Leu His Thr Leu Ile Met Val Gly Gly	
65 70 75	
ggc ccc tat ctc tgc tgg atg ggt tac cag atg cta cgt ggt gca ctg	463
Gly Leu Tyr Leu Cys Trp Met Gly Tyr Gln Met Leu Arg Gly Ala Leu	
80 85 90	
aaa aaa gag gcg gtt tct gca cct gcg cca cag gtc gag ctg gcg aaa	516
Lys Lys Glu Ala Val Ser Ala Pro Ala Pro Gln Val Glu Leu Ala Lys	
95 100 105 110	
agt ggg cgc agt ttc ctg aaa ggt tta ctg acc aat ctc gct aat ccg	564
Ser Gly Arg Ser Phe Leu Lys Gly Leu Leu Thr Asn Leu Ala Asn Pro	
115 120 125	
aaa gcg att atc tac ttt ggc tcg gtg ttc tca ttg ttt gtc ggt gat	612
Lys Ala Ile Ile Tyr Phe Gly Ser Val Phe Ser Leu Phe Val Gly Asp	
130 135 140	
aac gtt ggc act acc gcg cgc tgg ggc att ttt gcg ctg atc att gtc	660
Asn Val Gly Thr Thr Ala Arg Trp Gly Ile Phe Ala Leu Ile Val	
145 150 155	

gaa acg ctg gcg tgg ttt acc gtc gtt gcc agc ctg ttt gcc ctg ccg		708	
Glu Thr Leu Ala Trp Phe Thr Val Val Ala Ser Leu Phe Ala Leu Pro			
160	165	170	
caa atg cgc cgt ggt tat caa cgt ctg gcg aag tgg att gat ggt ttt		756	
Gln Met Arg Arg Gly Tyr Gln Arg Leu Ala Lys Trp Ile Asp Gly Phe			
175	180	185	190
gcc ggg gcg tta ttt gcc gga ttt ggc att cat ttg att att tcg cg		804	
Ala Gly Ala Leu Phe Ala Gly Phe Gly Ile His Leu Ile Ile Ser Arg			
195	200	205	
tgatgccaga cgcgtttca gagtaagtgc gataag		840	

2. Способ получения аминокислот L-тронина, или L-гомосерина, или L-валина, или L-лейцина путем культивирования устойчивых к L-тронину штаммов-продуцентов бактерий рода *Escherichia* в подходящей питательной среде с последующим выделением и очисткой целевой аминокислоты, отличающийся тем, что в качестве продуцентов используют бактерии *E. coli*, с повышенной устойчивостью к L-тронину, которая обусловлена повышенным содержанием в клетках этих бактерий белка RhtC, кодируемого фрагментом ДНК rhtC по п. 1.

Фрагмент ДНК *rhtC*, кодирующий синтез белка RhtC, придающего повышенную устойчивость к L-тронину бактериям *Escherichia coli*, и способ получения L-аминокислот.



Фиг. 1.

Фрагмент ДНК rhtC, кодирующий синтез белка RhtC, придающего повышенную устойчивость к L-треонину бактериям *Escherichia coli*, и способ получения L-аминокислот.

Met	Leu	Met	Leu	Phe	Leu	Thr	Val	Ala	Met	Val	His	Ile	Val	Ala	Leu
1									5		10				15
Met	Ser	Pro	Gly	Pro	Asp	Phe	Phe	Val	Ser	Gln	Thr	Ala	Val	Ser	
									20		25				30
Arg	Ser	Arg	Lys	Glu	Ala	Met	Met	Gly	Val	Leu	Gly	Ile	Thr	Cys	Gly
						35		40				45			
Val	Met	Val	Trp	Ala	Gly	Ile	Ala	Leu	Leu	Gly	Leu	His	Leu	Ile	Ile
						50		55			60				
Glu	Lys	Met	Ala	Trp	Leu	His	Thr	Leu	Ile	Met	Val	Gly	Gly	Gly	Leu
						65		70			75				80
Tyr	Leu	Cys	Trp	Met	Gly	Tyr	Gln	Met	Leu	Arg	Gly	Ala	Leu	Lys	Lys
						85			90			95			
Glu	Ala	Val	Ser	Ala	Pro	Ala	Pro	Gln	Val	Glu	Leu	Ala	Lys	Ser	Gly
						100			105			110			
Arg	Ser	Phe	Leu	Lys	Gly	Leu	Leu	Thr	Asn	Leu	Ala	Asn	Pro	Lys	Ala
						115			120			125			
Ile	Ile	Tyr	Phe	Gly	Ser	Val	Phe	Ser	Leu	Phe	Val	Gly	Asp	Asn	Val
						130		135			140				
Gly	Thr	Thr	Ala	Arg	Trp	Gly	Ile	Phe	Ala	Leu	Ile	Val	Glu	Thr	
						145		150			155				160
Leu	Ala	Trp	Phe	Thr	Val	Val	Ala	Ser	Leu	Phe	Ala	Leu	Pro	Gln	Met
						165		..	170			175			
Arg	Arg	Gly	Tyr	Gln	Arg	Leu	Ala	Lys	Trp	Ile	Asp	Gly	Phe	Ala	Gly
						180			185			190			
Ala	Leu	Phe	Ala	Gly	Phe	Gly	Ile	His	Leu	Ile	Ile	Ser	Arg		
						195		200			205				

Фиг. 2.

Фрагмент ДНК rhtC, кодирующий синтез белка RhtC, придающего повышенную устойчивость к L-тронину бактериям Escherichia coli, и способ получения L-аминокислот.

agaaataatg tggagatcgc accgccccatc gaatgtgccca gtatatacg tttacgccccac 60	
ggaccgggct gaaccttcctg ctgcccagaat gccggccagat catcaacata atcattaaag 120	
cgattaacat gcccggatg cgatcggtt aacaggccac cggaaacgtcc ctgcccgcga 180	
tgttcgtatga ttaagacatc aaaccccaa tggaaacaggt cataggccag ttccgcataat 240	
tttacgttagc tctcaatcgc ccccgccggatg atgactacca cccggtcatg gtgttgtcg 300	
cggaaaacggc caaaaggccac cggaaatgt <u>ca</u> tccacaccag taaactctgc ttcatcacgc 360	
tgacgcccaga aatcagtca cgggtcccatg gtaaaaaggc aaaaacgcgtt ttctcttgc 420	
tccaggcttt tttgtctctg aaacatcggg taatctgcct cttaaaccac gtaaaaatcgt 480	
tttttttagc gtgcctgaca caacgctgcg acagtagcgt attgtggcac aaaaatagac 540	
acaccgggag ttcatc atg acc tta gaa tgg tgg ttt gcc tac ctg ctg aca 592	
Met Thr Leu Glu Trp Trp Phe Ala Tyr Leu Leu Thr	
1 5 10	
tcg atc att tta acg ctg tcg cca ggc tct ggt gca atc aac act atg 640	
Ser Ile Ile Leu Thr Leu Ser Pro Gly Ser Gly Ala Ile Asn Thr Met	
15 20 25	
acc acc tcg ctc aac cac ggt tat ccc gcc ggt ggc gtc tat tgc tgg 688	
Thr Thr Ser Leu Asn His Gly Tyr Pro Ala Gly Val Tyr Cys Trp	
30 35 40	
gct tca gac cgg act ggc gat tca tat tgt gct ggt tgg cgt ggg gtt 736	
Ala Ser Asp Arg Thr Gly Asp Ser Tyr Cys Ala Gly Trp Arg Gly Val	
45 50 55 60	
ggg acg cta ttt tcc cgc tca gtg att gca ttt qaa qtq ttq aaq tqq 784	
Gly Thr Leu Phe Ser Arg Ser Val Ile Ala Phe Glu Val Leu Lys Trp	
65 70 75	
cca ccc ccc oct tac tta att taa cta cca atc caa caa taa cac acc 832	
Ala Gly Ala Ala Tyr Leu Ile Trp Leu Gly Ile Gln Gln Trp Arg Ala	
80 85 90	
gct ggt gca att gac ctt aaa tcg ctg gcc tct act caa tcg cgt cga 880	
Ala Gly Ala Ile Asp Leu Lys Ser Leu Ala Ser Thr Gln Ser Arg Arg	
95 100 105	
cat ttg ttc cag cgc gca gtt ttt gtg aat ctc acc aat ccc aaa agt 928	
His Leu Phe Gln Arg Ala Val Phe Val Asn Leu Thr Asn Pro Lys Ser	
110 115 120	
att gtg ttt ctg gcg cta ttt ccg caa ttc atc atg ccg caa cag 976	
Ile Val Phe Leu Ala Leu Phe Pro Gln Phe Ile Met Pro Gln Gln	
125 130 135 140	
ccg caa ctg atg cag tat atc gtg ctc ggc gtc acc act att gtg gtc 1024	
Pro Gln Leu Met Gln Tyr Ile Val Leu Gly Val Thr Thr Ile Val Val	
145 150 155	
gat att att gtg atg atc ggt tac gcc acc ctt gct caa cgg att gct 1072	
Asp Ile Ile Val Met Ile Gly Tyr Ala Thr Leu Ala Gln Arg Ile Ala	
160 165 170	
cta tgg att aaa gga cca aag cag atg aag gcg ctg aat aag att ttc 1120	
Leu Trp Ile Lys Gly Pro Lys Gln Met Lys Ala Leu Asn Lys Ile Phe	
175 180 185	
ggc tcg ttg ttt atg ctg gtg gga gcg ctg tta gca tcg gcg agg cat 1168	
Gly Ser Leu Phe Met Leu Val Gly Ala Leu Leu Ala Ser Ala Arg His	
190 195 200	
gcg tgaaaaataa tgcgttatgc ggcgtaaacg ctttatccga cttactctga 1221	
Ala	
205	
agacgcgtct	1231

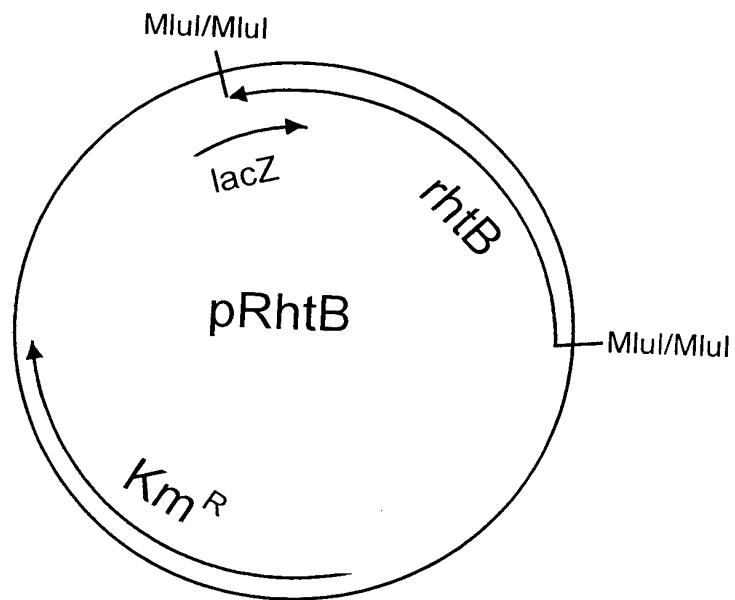
Фиг. 3.

Фрагмент ДНК rhtC, кодирующий синтез белка RhtC, придающего повышенную устойчивость к L-треонину бактериям *Escherichia coli*, и способ получения L-аминокислот.

Met	Thr	Leu	Glu	Trp	Trp	Phe	Ala	Tyr	Leu	Leu	Thr	Ser	Ile	Ile	Leu
1				5					10						15
Thr	Leu	Ser	Pro	Gly	Ser	Gly	Ala	Ile	Asn	Thr	Met	Thr	Thr	Ser	Leu
					20				25						30
Asn	His	Gly	Tyr	Pro	Ala	Gly	Gly	Val	Tyr	Cys	Trp	Ala	Ser	Asp	Arg
					35			40				45			
Thr	Gly	Asp	Ser	Tyr	Cys	Ala	Gly	Trp	Arg	Gly	Val	Gly	Thr	Leu	Phe
					50			55			60				
Ser	Arg	Ser	Val	Ile	Ala	Phe	Glu	Val	Leu	Lys	Trp	Ala	Gly	Ala	Ala
				65			70			75					80
Tyr	Leu	Ile	Trp	Leu	Gly	Ile	Gln	Gln	Trp	Arg	Ala	Ala	Gly	Ala	Ile
					85			90			95				
Asp	Leu	Lys	Ser	Leu	Ala	Ser	Thr	Gln	Ser	Arg	Arg	His	Leu	Phe	Gln
					100			105				110			
Arg	Ala	Val	Phe	Val	Asn	Leu	Thr	Asn	Pro	Lys	Ser	Ile	Val	Phe	Leu
				115				120			125				
Ala	Ala	Leu	Phe	Pro	Gln	Phe	Ile	Met	Pro	Gln	Gln	Pro	Gln	Leu	Met
				130			135			140					
Gln	Tyr	Ile	Val	Leu	Gly	Val	Thr	Thr	Ile	Val	Val	Asp	Ile	Ile	Val
				145			150			155			160		
Met	Ile	Gly	Tyr	Ala	Thr	Leu	Ala	Gln	Arg	Ile	Ala	Leu	Trp	Ile	Lys
					165			170			175				
Gly	Pro	Lys	Gln	Met	Lys	Ala	Leu	Asn	Lys	Ile	Phe	Gly	Ser	Leu	Phe
					180			185			190				
Met	Leu	Val	Gly	Ala	Leu	Leu	Ala	Ser	Ala	Arg	His	Ala			
				195			200			205					

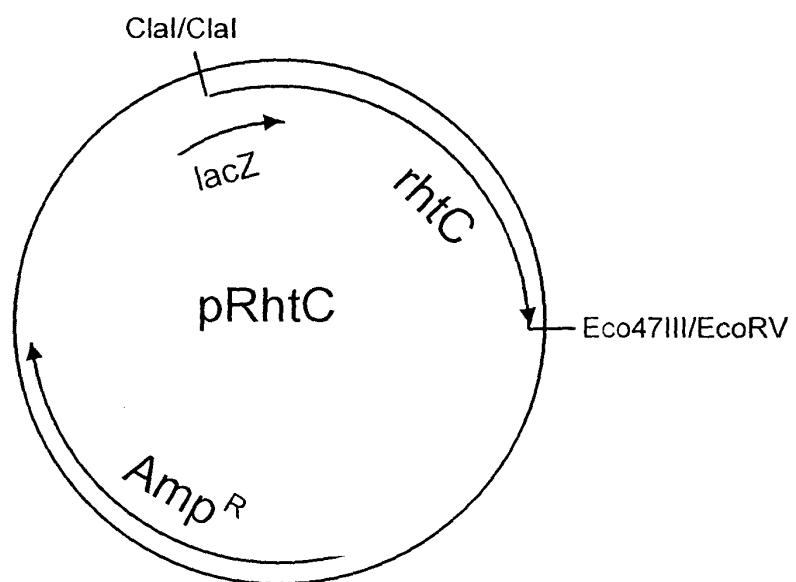
Фиг. 4.

Фрагмент ДНК *rhtC*, кодирующий синтез белка RhtC, придающего повышенную устойчивость к L-тронину бактериям *Escherichia coli*, и способ получения L-аминокислот.



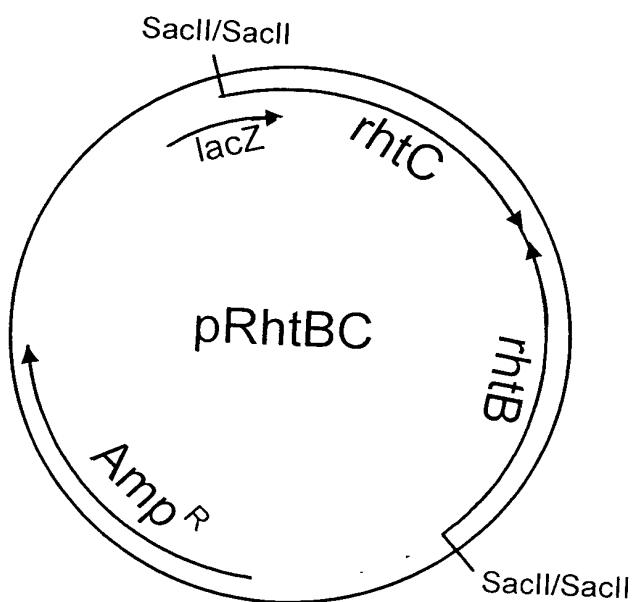
Фиг. 5.

Фрагмент ДНК *rhtC*, кодирующий синтез белка RhtC, придающего повышенную устойчивость к L-тронину бактериям *Escherichia coli*, и способ получения L-аминокислот.



Фиг. 6.

Фрагмент ДНК *rhtC*, кодирующий синтез белка RhtC, придающего повышенную устойчивость к L-тронину бактериям *Escherichia coli*, и способ получения L-аминокислот.

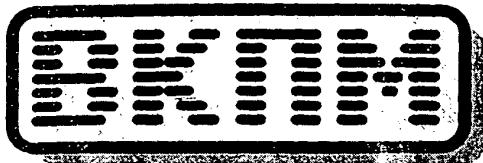


Фиг. 7.

РЕФЕРАТ

ФРАГМЕНТ ДНК *rhtC*, КОДИРУЮЩИЙ СИНТЕЗ БЕЛКА *RhtC*, ПРИДАЮЩЕГО ПОВЫШЕННУЮ УСТОЙЧИВОСТЬ К L-ТРЕОНИНУ БАКТЕРИЯМ *ESCHERICHIA COLI*, И СПОСОБ ПОЛУЧЕНИЯ L-АМИНОКИСЛОТ

Изобретение относится к биотехнологии и генетической инженерии. Заявлен фрагмент ДНК *rhtC*, кодирующий синтез белка *RhtC*, который придает повышенную устойчивость к L-треонину бактериям *Escherichia coli*. На основе мультикопийной плазиды, *pRhtC*, содержащей этот фрагмент, сконструированы штамм *E. coli* MG442/*pRhtC*, – продуцент L-гомосерина и штамм *E.coli* MG442/*pVIC40*, *pRhtC* – продуцент L-треонина, способные к повышенной продукции указанных аминокислот по сравнению со штаммами, не содержащими плазиду *pRhtC*. Получены также штаммы *E. coli* NZ10/*pRhtBC* и NZ10/*pRhtB*, *pRhtC* содержащие на плазидах кроме гена *rhtC* также ген *rhtB*, придающий клеткам устойчивость к L-гомосерину. Эти штаммы обладают повышенной способностью к продукции L-гомосерина, L-валина и L-лейцина по сравнению со штаммами, не содержащими указанных плазид. Описаны физиолого-биохимические, культурально-морфологические свойства новых штаммов. Описан способ получения аминокислот с использованием новых штаммов-продуцентов.



Всероссийская Коллекция Промышленных Микроорганизмов

Россия, Москва, 113545, 1-ый Дорожный проезд, 1, ГНИИ Генетика - ВКПМ;
(095) 3151210; факс: (095) 3150501; телекс: 411718 GENOM SU; Эл. почта: vkpm@vnigen.msk.su;

6009

22 декабря 98

С П Р А В К А

Всероссийская Коллекция Промышленных Микроорганизмов
(ВКПМ), ГНИИГенетика
приняла на национальное патентное депонирование
08 декабря 1998 года

культуру *Escherichia coli* MG 442 (vic40)(pRHTC)

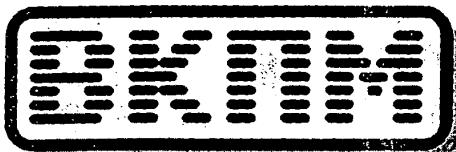
Продукт, синтезируемый штаммом: треонин

Депозитор: ГосНИИгенетика



Зав. ВКПМ

КОЛЛЕКЦИОННЫЙ НОМЕР ВКПМ В-7680



Всероссийская Коллекция Промышленных Микроорганизмов

Россия, Москва, 113545, 1-ый Дорожный проезд, 1, ГНИИ Генетика - ВКПМ;
(095) 3151210; факс: (095) 3150501; телекс: 411718 GENOM SU; Эл. почта: vkpm@vnigen.msk.su;

6009

22 декабря 98

С П Р А В К А

Всероссийская Коллекция Промышленных Микроорганизмов
(ВКПМ), ГНИИГенетика
приняла на национальное патентное депонирование
08 декабря 1998 года

культуру *Escherichia coli* NZ10 (pRHTC)(pRHTB)

Продукт, синтезируемый штаммом:

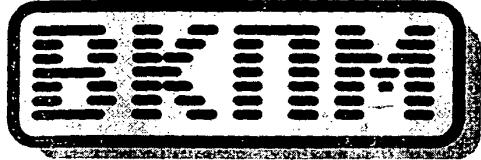
гомосерин, валин, лейцин

Депозитор: ГосНИИгенетика



Зав. ВКПМ

КОЛЛЕКЦИОННЫЙ НОМЕР ВКПМ В-7681



Всероссийская Коллекция Промышленных Микроорганизмов

Россия, Москва, 113545, 1-ый Дорожный проезд, 1, ГНИИ Генетика - ВКПМ;
(095) 3151210; факс: (095) 3150501; телекс: 411718 GENOM SU; Эл. почта: vkpm@vnigen.msk.su;

6009

22 декабря 98

С П Р А В К А

Всероссийская Коллекция Промышленных Микроорганизмов

(ВКПМ), ГНИИГенетика

приняла на национальное патентное депонирование

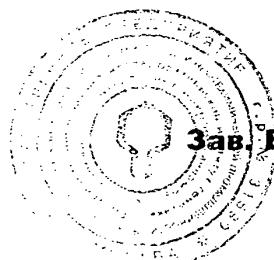
08 декабря 1998 года

культуру *Escherichia coli* NZ10 (pRHTBC)

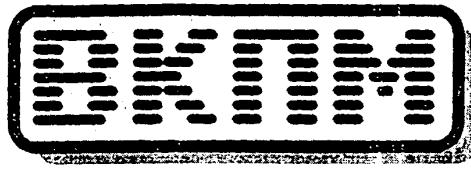
Продукт, синтезируемый штаммом:

гомосерин, валин, лейцин

Депозитор: ГосНИИГенетика



КОЛЛЕКЦИОННЫЙ НОМЕР ВКПМ В-7682



Всероссийская Коллекция Промышленных Микроорганизмов

Россия, Москва, 113545, 1-ый Дорожный проезд, 1, ГНИИ Генетика - ВКПМ;
(095) 3151210; факс: (095) 3150501; телекс: 411718 GENOM SU; Эл. почта: vkpm@vnigen.msk.su;

6009

22 декабря 98

С П Р А В К А

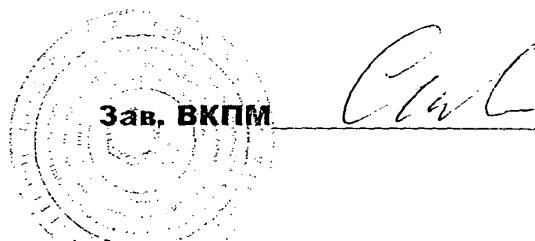
**Всероссийская Коллекция Промышленных Микроорганизмов
(ВКПМ), ГНИИГенетика**
приняла на национальное патентное депонирование
08 декабря 1998 года

культуру *Escherichia coli* NZ10 (pRHTB)

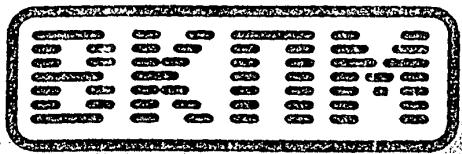
Продукт, синтезируемый штаммом:

гомосерин

Депозитор: ГосНИИгенетика



КОЛЛЕКЦИОННЫЙ НОМЕР ВКПМ В-7683



Всероссийская Коллекция Промышленных Микроорганизмов

Россия, Москва, 113545, 1-ый Дорожный проезд, 1, ГНИИ Генетика - ВКПМ;
(095) 3151210; факс: (095) 3150501; телекс: 411718 GENOM SU; Эл. почта: vkpm@vnigen.msk.su;

6009

22 декабря 98

С П Р А В К А

Всероссийская Коллекция Промышленных Микроорганизмов
(ВКПМ), ГНИИГенетика
приняла на национальное патентное депонирование
08 декабря 1998 года

культуру *Escherichia coli* NZ10 (pRhtC)

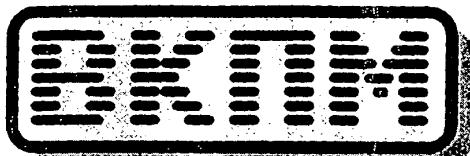
Продукт, синтезируемый штаммом:

гомосерин

Депозитор: ГосНИИгенетика

Зав. ВКПМ

КОЛЛЕКЦИОННЫЙ НОМЕР ВКПМ В-7684



Всероссийская Коллекция Промышленных Микроорганизмов

Россия, Москва, 113545, 1-ый Дорожный проезд, 1, ГНИИ Генетика - ВКПМ;
(095) 3151210; факс: (095) 3150501; телекс: 411718 GENOM SU; Эл. почта: vkpm@vnigen.msk.su;

6009

22 декабря 98

С П Р А В К А

Всероссийская Коллекция Промышленных Микроорганизмов
(ВКПМ), ГНИИГенетика
приняла на национальное патентное депонирование
08 декабря 1998 года

культуру *Escherichia coli* NZ10 (pUC21)

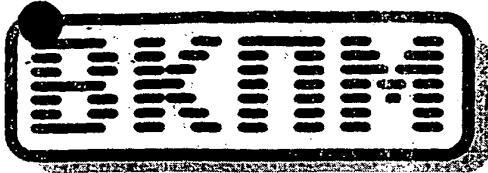
Продукт, синтезируемый штаммом:

гомосерин

Депозитор: ГосНИИгенетика



КОЛЛЕКЦИОННЫЙ НОМЕР ВКПМ В-7685



Всероссийская Коллекция Промышленных Микроорганизмов

Россия, Москва, 113545, 1-ый Дорожный проезд, 1, ГНИИ Генетика - ВКПМ;
(095) 3151210; факс: (095) 3150501; телекс: 411718 GENOM SU; Эл. почта: vkpm@vnigen.msk.su;

6009

22 декабря 98

С П Р А В К А

Всероссийская Коллекция Промышленных Микроорганизмов
(ВКПМ), ГНИИГенетика
приняла на национальное патентное депонирование
08 декабря 1998 года

культуру *Escherichia coli* MG 442 (pRHTC)

Продукт, синтезируемый штаммом: гомосерин, треонин

Депозитор: ГосНИИгенетика



КОЛЛЕКЦИОННЫЙ НОМЕР ВКПМ В-7700

Appendix 3

page 14

Budapest treaty on the international
recognition of the deposit of microorganisms
for the purposes of patent procedure

JC511 U.S. PTO
09/466935
12/20/99



To
State Scientific Centre of
Russian Federation
GNIIGENETIKA

Moscow 113545
1-st Dorozhny proezd 1 Russia
name and address
of depositor

INTERNATIONAL FORM

receipt in the case of an original deposit
issued pursuant to Rule 7.1 by the
INTERNATIONAL DEPOSITORY AUTHORITY
identified at the bottom of this page

I. IDENTIFICATION OF THE MICROORGANISM

Identification reference given by the DEPOSITOR	Accession number given by the INTERNATIONAL DEPOSITORY- AUTHORITY: VKPM B-7680
Escherichia coli MG442 (vic40) (pRHTC)	

II. SCIENTIFIC DESCRIPTION AND/OR PROPOSED TAXONOMIC DESIGNATION

The microorganism identified under I above was accompanied by:

a scientific description Producer of threonine
 a proposed taxonomic designation
(Mark with a cross where applicable)

III. RECEIPT AND ACCEPTANCE

This International Depository Authority accepts the microorganism identified under I above,
1
which was received by it on 08.12.1998 (date of original deposit)

IV. RECEIPT OF REQUEST FOR CONVERSION

The microorganism identified under I above was received by this International Depository
Authority
on (date of original deposit) and a request to convert
the
original deposit to a deposit under the Budapest Treaty was received by it on
(date of receipt of request for conversion)

V. INTERNATIONAL DEPOSITORY AUTHORITY

Name: Russian National Collection
of Industrial Microorganisms (VKPM)
Depository
GNIIGENETIKA
Address: Russia 113545 Moscow
1 Dorozhny proezd 1

Signature(s) of person(s) having the
power to represent the International

Authority or authorized official(s).

Date: 12/20/99 S.P.

1 Where Rule 6.4(d) applies, such date is the date on which the status of international
depository authority was acquired

Appendix 3

page 14

**Budapest treaty on the international
recognition of the deposit of microorganisms
for the purposes of patent procedure**

To
State Scientific Centre of
Russian Federation
GNIIGENETIKA

Moscow 113545
1-st Dorozhny proezd 1 Russia
name and address
of depositor

INTERNATIONAL FORM

receipt in the case of an original deposit
issued pursuant to Rule 7.1 by the

INTERNATIONAL DEPOSITORY AUTHORITY
identified at the bottom of this page

I. IDENTIFICATION OF THE MICROORGANISM

Identification reference given by the
DEPOSITOR

Escherichia coli NZ10 (pRHTC) (pRHTB)

Accession number given by the
**INTERNATIONAL DEPOSITORY-
AUTHORITY:**
VKPM B-7681

II. SCIENTIFIC DESCRIPTION AND/OR PROPOSED TAXONOMIC DESIGNATION

The microorganism identified under I above was accompanied by:

- a scientific description Producer of homoserine
 a proposed taxonomic designation
(Mark with a cross where applicable)

III. RECEIPT AND ACCEPTANCE

This International Depository Authority accepts the microorganism identified under I above,
1 which was received by it on 08.12.1998 (date of original deposit)

IV. RECEIPT OF REQUEST FOR CONVERSION

The microorganism identified under I above was received by this International Depository
Authority
on (date of original deposit) and a request to convert
the
original deposit to a deposit under the Budapest Treaty was received by it on
(date of receipt of request for conversion)

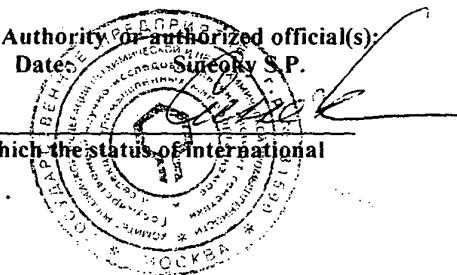
V. INTERNATIONAL DEPOSITORY AUTHORITY

Name: Russian National Collection
of Industrial Microorganisms (VKPM)
Depository
GNIIGenetika
Address: Russia 113545 Moscow
1 Dorozhny proezd 1

Signature (s) of person(s) having the
power to represent the International

Authority or authorized official(s):
Date: 12.12.1998 Smeeky S.P.

1 Where Rule 6.4(d) applies, such date is the date on which the status of International
depository authority was acquired



Appendix 3

page 14

**Budapest treaty on the international
recognition of the deposit of microorganisms
for the purposes of patent procedure**

To
State Scientific Centre of
Russian Federation
GNIIGENETIKA
.
Moscow 113545
1-st Dorozhny proezd 1 Russia
name and address
of depositor

INTERNATIONAL FORM

receipt in the case of an original deposit
issued pursuant to Rule 7.1 by the
INTERNATIONAL DEPOSITORY AUTHORITY
identified at the bottom of this page

I. IDENTIFICATION OF THE MICROORGANISM

Identification reference given by the DEPOSITOR	Accession number given by the INTERNATIONAL DEPOSITORY- AUTHORITY:
Escherichia coli NZ10 (pRHTBC)	VKPM B-7682

II. SCIENTIFIC DESCRIPTION AND/OR PROPOSED TAXONOMIC DESIGNATION

The microorganism identified under I above was accompanied by:

x a scientific description Producer of homoserine

a proposed taxonomic designation
(Mark with a cross where applicable)

III. RECEIPT AND ACCEPTANCE

This International Depository Authority accepts the microorganism identified under I above,
which was received by it on 08.12.1998 (date of original deposit)

IV. RECEIPT OF REQUEST FOR CONVERSION

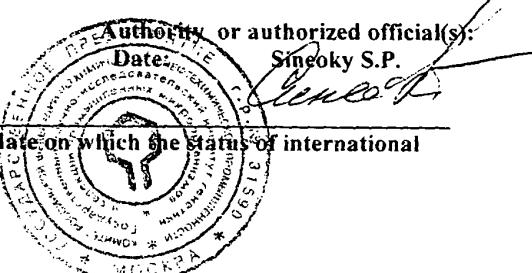
The microorganism identified under I above was received by this International Depository Authority
on _____ (date of original deposit) and a request to convert
the original deposit to a deposit under the Budapest Treaty was received by it on
(date of receipt of request for conversion)

V. INTERNATIONAL DEPOSITORY AUTHORITY

Name: Russian National Collection
of Industrial Microorganisms (VKPM)
Depository
GNIIgenetika
Address: Russia 113545 Moscow
1 Dorozhny proezd 1

Signature (s) of person(s) having the power to represent the International

**1 Where Rule 6.4(d) applies, such date is the date on which the status of international
depository authority was acquired**



Appendix 3
page 14

Budapest treaty on the international recognition of the deposit of microorganisms for the purposes of patent procedure

**To
State Scientific Centre of
Russian Federation
GNIIGENETIKA**

Moscow 113545
1-st Dorozhny proezd 1 Russia
name and address
of depositor

INTERNATIONAL FORM

receipt in the case of an original deposit
issued pursuant to Rule 7.1 by the
INTERNATIONAL DEPOSITORY AUTHORITY
identified at the bottom of this page

I. IDENTIFICATION OF THE MICROORGANISM

**Identification reference given by the
DEPOSITOR**

**Accession number given by the
INTERNATIONAL DEPOSITORY-
AUTHORITY:
VKPM B-7683**

II. SCIENTIFIC DESCRIPTION AND/OR PROPOSED TAXONOMIC DESIGNATION

The microorganism identified under I above was accompanied by:

x a scientific description Producer of homoserine

a proposed taxonomic designation
(Mark with a cross where applicable)

III. RECEIPT AND ACCEPTANCE

This International Depository Authority accepts the microorganism identified under I above,
1 which was received by it on 08.12.1998 (date of original deposit)

IV. RECEIPT OF REQUEST FOR CONVERSION

The microorganism identified under I above was received by this International Depositary Authority on (date of original deposit) and a request to convert the original deposit to a deposit under the Budapest Treaty was received by it on (date of receipt of request for conversion)

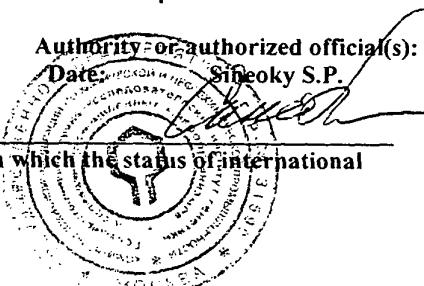
V. INTERNATIONAL DEPOSITORY AUTHORITY

Name: Russian National Collection
of Industrial Microorganisms (VKPM)
Depository
GNIIgenetika
Address: Russia 113545 Moscow
1 Dorozhny proezd 1

Signature (s) of person(s) having the power to represent the International

Authority or authorized official(s):
Date: 12/20/2014 **Simeoky S.P.**

I Where Rule 6.4(d) applies, such date is the date on which the status of international
depository authority was acquired



Appendix 3
page 14

Budapest treaty on the international recognition of the deposit of microorganisms for the purposes of patent procedure

To
State Scientific Centre of
Russian Federation
GNIIGENETIKA

Moscow 113545
1-st Dorozhny proezd 1 Russia
name and address
of depositor

INTERNATIONAL FORM

receipt in the case of an original deposit
issued pursuant to Rule 7.1 by the
INTERNATIONAL DEPOSITORY AUTHORITY
identified at the bottom of this page

I. IDENTIFICATION OF THE MICROORGANISM

**Identification reference given by the
DEPOSITOR**

**Accession number given by the
INTERNATIONAL DEPOSITORY-
AUTHORITY:
VKRM. B. 7684**

Escherichia coli NZ10 (pRHTC)

II. SCIENTIFIC DESCRIPTION AND/OR PROPOSED TAXONOMIC DESIGNATION

The microorganism identified under I above was accompanied by:

a scientific description. Producer of homoserine

a proposed taxonomic designation
(Mark with a cross where applicable)

III. RECEIPT AND ACCEPTANCE

This International Depository Authority accepts the microorganism identified under I above,
which was received by it on 08.12.1998 (date of original deposit)

IV. RECEIPT OF REQUEST FOR CONVERSION

The microorganism identified under I above was received by this International Depository Authority.

Authority
on _____ (date of original deposit) and a request to convert
the
original deposit to a deposit under the Budapest Treaty was received by it on
(date of receipt of request for conversion)

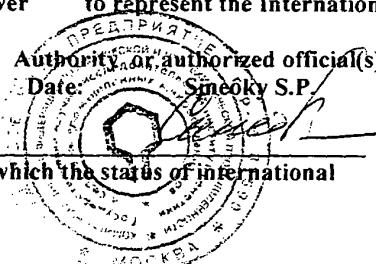
V. INTERNATIONAL DEPOSITORY AUTHORITY

Name: Russian National Collection
of Industrial Microorganisms (VKPM)
Depository
GNIIgenetika
Address: Russia 113545 Moscow
1 Dorozhny proezd 1

Signature (s) of person(s) having the power to represent the International

Authority or authorized official(s):
Date: 12-1-68 Smeoky S P

**1 Where Rule 6.4(d) applies, such date is the date on which the status of international
depository authority was acquired**



Appendix 3

page 14

Budapest treaty on the international recognition of the deposit of microorganisms for the purposes of patent procedure

To
State Scientific Centre of
Russian Federation
GNIIGENETIKA
.
Moscow 113545
!-st Dorozhny proezd 1 R
name and address
of depositor

INTERNATIONAL FORM
receipt in the case of an original deposit
issued pursuant to Rule 7.1 by the
INTERNATIONAL DEPOSITORY AUTHORITY
identified at the bottom of this page

I. IDENTIFICATION OF THE MICROORGANISM

**Identification reference given by the
DEPOSITOR**

**Accession number given by the
INTERNATIONAL DEPOSITORY-
AUTHORITY:
VKPM B-7685**

Escherichia coli NZ10 (pUC21)

II. SCIENTIFIC DESCRIPTION AND/OR PROPOSED TAXONOMIC DESIGNATION

The microorganism identified under I above was accompanied by:

x a scientific description Producer of homoserine

a proposed taxonomic designation
(Mark with a cross where applicable)

III. RECEIPT AND ACCEPTANCE

which was received by it on 08.12.1998 (date of original deposit)

IV. RECEIPT OF REQUEST FOR CONVERSION

The microorganism identified under I above was received by this International Depository Authority
on (date of original deposit) and a request to convert
the
original deposit to a deposit under the Budapest Treaty was received by it on
(date of receipt of request for conversion)

V. INTERNATIONAL DEPOSITORY AUTHORITY

Name: Russian National Collection
of Industrial Microorganisms (VKPM)
Depository
GNIigenetika
Address: Russia 113545 Moscow
1 Dorozhny proezd 1

**Signature (s) of person(s) having the
power to represent the International**

 Authority or authorized official(s): Date:	<u>Sineoky S.P.</u> <u>1988</u>
<hr/> In which the status of international	

**I Where Rule 6.4(d) applies, such date is the date on which the status of international
depository authority was acquired**

Appendix 3

page 14

Budapest treaty on the international recognition of the deposit of microorganisms for the purposes of patent procedure

To
State Scientific Centre of
Russian Federation
GNIIGENETIKA
. .
Moscow 113545
1-st Dorozhny proezd 1 R
name and address
of depositor

INTERNATIONAL FORM

receipt in the case of an original deposit issued pursuant to Rule 7.1 by the

INTERNATIONAL DEPOSITORY AUTHORITY
identified at the bottom of this page

I. IDENTIFICATION OF THE MICROORGANISM

**Identification reference given by the
DEPOSITOR**

Accession number given by the
**INTERNATIONAL DEPOSITORY-
AUTHORITY:**
VKRM R 7760

Escherichia coli MG442 (pRHTC)

II. SCIENTIFIC DESCRIPTION AND/OR PROPOSED TAXONOMIC DESIGNATION

The microorganism identified under I above was accompanied by:

x a scientific description Producer of threonine, homoserine

a proposed taxonomic designation
(Mark with a cross where applicable)

III. RECEIPT AND ACCEPTANCE

This International Depository Authority accepts the microorganism identified under I above,
1
1. A deposit was received by it on 09.12.1982. (Date of receipt) 1. Date of deposit

(date of original deposit)

IV. RECEIPT OF REQUEST FOR CONVERSION

The microorganism identified under I above was received by this International Depositary Authority

on the (date of original deposit) and a request to convert

original deposit to a deposit under the Budapest Treaty was received by it on
(date of receipt of request for conversion)

V. INTERNATIONAL DEPOSITORY AUTHORITY

Name: Russian National Collection
of Industrial Microorganisms (VKPM)
Depository

Signature (s) of person(s) having the power to represent the International

GNIgenetika
Address: Russia 113545 Moscow
1 Dorozhny proezd 1

Authority or authorized official(s):

Sineoky S.P.

**1 Where Rule 6.4(d) applies, such date is the day on which the status of international
depository authority was acquired**

